P2 260 c4

MÉMOIRES
DU
MUSÉUM NATIONAL
D'HISTOIRE NATURELLE

NOUVELLE SÉRIE

Série D, Sciences Physico-chimiques

TOME I

FASCICULE 3

M.-R. DE MAHEAS

ÉTUDE
DES CONSTITUANTS TRITERPÉNIQUES
DE JACQUINIA ARMILLARIS JACQ.

PARIS
ÉDITIONS DU MUSÉUM
36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire (V^e^)

1962

BIBL. DU MUSÉUM PARIS

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

P2 260 C9

MÉMOIRES DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
Série D. Sciences physico-chimiques. Tome I, fasc. 3.–P. 63 à 105

ÉTUDE DES CONSTITUANTS TRITERPÉNIQUES DE JACQUINIA ARMILLARIS JACQ.

par

M.-R. DE MAHEAS

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 65
INTRODUCTION 66

Ire PARTIE. ESSAIS PRÉLIMINAIRES 67

IIe PARTIE. ISOLEMENT DES GÉNINES 70

A. — Extraction. — Hydrolyse 70
B. — Chromatographie sur papier 70
C. — Chromatographie préparative 71

IIIe PARTIE. — IDENTIFICATION ET STRUCTURES 75

A. — Génine C 75
B. — Génine D 85
Groupements oxygénés 86
Double liaison 86
Hydrogénation catalytique 87
Oxydation chromique 88
Réduction 89
Hydrogénation 90
Position du groupement cétonique 91

PARTIE EXPÉRIMENTALE 94

Isolement de la fraction alcaloïdique 94
Isolement des saponines 95
Essais de déshydratation de la génine C et des diacétates I et IV . 95
Tosylation de l'acétate IV 96
Dérivé iodé du tosylate 96
Réduction de l'iodure 96

BIBL DU MUSEUM D'HIST. NATION.

Source : MNHN, Paris

Oxydation chromique du diacétate IV . . . 97
Oxydation chromique du triacétate II . . . 98
Dinitro-2,4-phénylhydrazone de la génine D . . . 98
Epoxyde de la génine D . . . 98
Réduction Wolff-Kishner . . . 99
Hydrogénation de la génine D par $LiAlH_4$ . . . 99
Oxydation chromique de la génine D . . . 100
Oxydation chromique de l'acétate . . . 100
Hydrogénation de la génine D . . . 101
Bromuration de l'époxyde de la génine D . . . 102
Oxydation periodique du tétrol . . . 102
Oxydation plombique du tétrol . . . 102
Dinitro-2,4-phénylhydrazone du produit d'oxydation . . . 103

Conclusion . . . 104

Bibliographie . . . 105

Source : MNHN, Paris

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été fait au Laboratoire de Chimie des corps organisés du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Au début de cet exposé, nous nous devons d'évoquer la mémoire du Professeur Sannié et sommes heureux de pouvoir exprimer ici notre gratitude pour avoir accueilli avec autant de bienveillance le débutant que nous étions et pour avoir bien voulu nous confier ce projet de recherche. C'est à son intervention que nous devons également la bourse du Muséum qui nous a matériellement aidé les deux premières années de ce travail.

Nous exprimons notre vive reconnaissance à M. le Professeur Mentzer qui, lors de son arrivée à ce laboratoire, a bien voulu nous laisser continuer sur ce sujet encore peu avancé à ce moment, et dont l'étendue des connaissances et l'enthousiasme constant ont été les facteurs déterminants de son achèvement.

Nous remercions tout particulièrement M. Frèrejacque, Sous-directeur honoraire, qui nous a abondamment fait profiter de sa très vaste expérience et dont les conseils et la conscience nous ont aidé à surmonter bien des difficultés et permis d'éviter bien des erreurs.

Enfin, nous remercions également tous les camarades du laboratoire dont l'aide et la sympathie ne se sont jamais démenties et nous ont apporté un appui constant.

M. le Professeur Prévost a bien voulu nous faire l'honneur de présider notre jury ; qu'il nous soit permis de lui exprimer notre gratitude respectueuse, ainsi qu'à M. le Professeur Kuhlmann et à M. le Professeur Julia, qui, malgré la multiplicité de leurs charges, ont accepté de faire partie de notre jury.

M. le Docteur Vendel, Directeur des Laboratoires Ana, nous a fourni les moyens matériels qui nous ont permis de terminer ce travail ; nous lui en exprimons notre vive reconnaissance.

Source : MNHN, Paris

INTRODUCTION

Les racines de *Jacquinia armillaris* Jacq. sont utilisées comme poison de pêche par les aborigènes de certaines contrées de l'Amérique Centrale.

C'est un arbre dont l'habitat est limité au Pérou, à l'Équateur et aux Antilles ; il appartient à la famille des Myrcinacées, voisine de la famille des Primulacées et de celle des Plumbaginacées ; sa composition chimique ne semble pas encore avoir été étudiée.

Nous n'avons pas trouvé plus de renseignements sur la constitution des quelques espèces voisines qui portent toutes le même nom de « Barbascos » dans leurs pays d'origine. Ce sont : *Jacquinia barbascos* et *J. revoluta* Jacq. au Vénézuela, *J. brasiliensis* au Brésil et *J. gracilis* en Colombie.

Le Laboratoire de Phanérogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle nous a confié les premiers échantillons de *J. armillaris* Jacq. pour que nous tentions d'en isoler les substances actives.

L'action ichtyotoxique et le fort pouvoir moussant des macérations aqueuses de ce végétal rendaient plausible la présence de saponines dont l'étude pouvait s'harmoniser avec le cadre des recherches de ce laboratoire.

Source : MNHN, Paris

PREMIÈRE PARTIE

ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Lors de ces premiers essais, nous ne disposions que de quelques centaines de grammes de matériel végétal. Quelques micro-réaction colorées nous ont permis de suivre la marche du travail, et nous ont constamment guidé au cours de cette étude : ce sont la réaction des sapogénines stéroliques mise au point par SANNIÉ et ses collaborateurs [1], la réaction de DRAGENDORFF modifiée par MUNIER [2], et surtout la réaction de NOLLER ; cette dernière, modifiée par SCHMIDIGER et CHERBULIEZ [3], est effectuée à l'aide d'un mélange de 6 parties de tétrachlorure d'étain, de 50 parties de tétrachlorure de carbone et de 50 parties d'acide acétique ; avec les triterpènes elle donne une coloration variant du rose au violet.

Le bois et l'écorce des racines et des tiges de *J. armillaris* Jacq. ont été séchés et broyés avant d'être traités par fractions de 100 g.

1° Un premier lot de 100 g, extrait par l'éthanol, laissait déposer, après concentration et refroidissement, une substance solide et blanchâtre qui, une fois décantée, n'a pu être redissoute ni dans l'alcool, ni dans le chloroforme.

Cette substance, par contre, s'est révélée très soluble dans l'eau chaude en formant une mousse abondante. Une goutte de cette solution, déposée sur une bande de papier, donnait une tache mauve avec le réactif de NOLLER modifié.

Nous avons eu ainsi, très rapidement, un premier indice de la présence de saponines triterpéniques.

L'hydrolyse acide de ce corps, suivie d'une extraction par l'éther et de l'évaporation du solvant, aboutit à un résidu solide (1,20 g) insoluble dans l'eau. Sa solution dans le méthanol, décolorée par le charbon et filtrée sur Célite, donne une tache lilas avec le réactif de NOLLER. Sa cristallisation n'a pu être obtenue, même après acétylation.

L'extrait alcoolique initial, après décantation de son dépôt solide, est évaporé à sec. Le résidu, amalgamé à de la Célite, est traité sur Soxhlet par le chloroforme. La chromatographie sur alumine de cet extrait aboutit à l'élution, par le mélange acétone-éthanol (9/1), d'une fraction dont une goutte déposée sur une bande de papier donne une tache orangée avec le réactif de DRAGENDORFF.

2° Sur un deuxième lot de 100 g de bois pulvérisé, nous avons tenté l'isolement, par la méthode de STAS-OTTO, de la substance du premier lot réagissant positivement avec le réactif de DRAGENDORFF. Le rendement,

Source : MNHN, Paris

très faible, correspondait à quelques mg d'un corps dont le comportement vis-à-vis des réactifs usuels est absolument conforme à celui d'un alcaloïde = réactif de Meyer, réactif de Dragendorff, acide picrique, acide picronolique, acide silico-tungstique.

La confirmation de l'existence simultanée de cet alcaloïde et d'alcools triterpéniques, serait un fait intéressant qui irait à l'encontre de l'opinion de Djerassi affirmant que triterpènes et alcaloïdes ne peuvent coexister dans la même plante [4].

3° Enfin, sur un troisième lot, l'isolement de la fraction triterpénique, sous forme de saponines, s'est révélé si difficultueuse — mousse abondante et prise en gel dès refroidissement ou concentration de la solution d'extraction — que nous avons préféré pratiquer l'hydrolyse acide des saponines directement sur l'extrait alcoolique pour atteindre plus rapidement au stade des aglycones. Nous avons conservé ce mode opératoire lors des extractions suivantes.

[Néanmoins, au cours d'un essai ultérieur sur 150 g de bois, nous avons pu isoler 4 g de saponines, par précipitation et trituration avec l'acétone, sous forme d'une poudre blanc-crème, fortement sternutatoire, représentant un rendement de 2,6% du matériel sec.]

L'hydrolysat, dilué par l'eau, a été extrait par l'éther ; l'extrait éthéré, lavé par la soude à 5% et par l'eau, puis séché et évaporé à sec, a laissé un résidu sec de 1,30 g, correspondant à un rendement en aglycone brut d'environ 2% du matériel sec.

Ce résidu, dissous dans l'éther isopropylique, cristallise en aiguilles fines, dont le point de fusion, après plusieurs recristallisations dans le même solvant, est de 230-233° (sublimation 190°). L'analyse ne fournit qu'un résultat approché pour une formule $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé	%	C	77,94	77,86	H	11,47	11,55
Calculé	%		78,55			10,99	

Le traitement d'une solution éthérée de cette substance par de la potasse aqueuse à 5% aboutit à la récupération du corps de départ inchangé et resté intégralement dans l'éther. Nous pouvions donc écarter l'hypothèse d'une génine acide.

Son appartenance à la série triterpénique a été confirmée par son comportement vis-à-vis des réactifs suivants :

1) Réactif des sapogénines stéroliques = pas de coloration.
2) Digitonine = à l'inverse des stérols il ne se forme pas de précipité.
3) Réactif de Noller modifié = coloration lilas.
4) Réactif de Liebermann = successivement rose, violet, bleu, vert.
5) Réactif de Salkowski = coloration rouge.
6) di-ter-butyl-2,6-p-crésol = coloration violette.

Ce réactif, signalé par Brinskorn [5], ne réagit qu'avec les triterpènes pentacycliques dont l'hydroxyle en C-3 n'est pas substitué. Sa sensibilité très grande, serait cent fois plus élevée avec les corps de cette série oxy-

Source : MNHN, Paris

genés en C-11. Pour nous, ce dernier point ne s'est pas vérifié. Quoi qu'il en soit, la réaction est encore très nette avec des solutions diluées au 1/100 000e.

D'autre part, la substance cristallisée donne avec le tétranitrométhane, en solution chloroformique, une coloration jaune qui révèle son insaturation.

En résumé, si ces essais préliminaires ne nous ont pas donné de résultats très précis, surtout en raison d'une quantité insuffisante de matériel, il nous ont au moins permis de confirmer la nature triterpénique de la fraction glycosidique des extraits de *J. armillaris* Jacq., et de constater l'importance de son rendement.

Notre travail a donc été naturellement orienté vers l'étude de cette fraction, plutôt que vers la fraction alealoïdique dont le rendement nous a paru très faible.

Nous avons également constaté que les teneurs en triterpènes des écorces, des racines, des tiges jeunes ou vieilles et du péricarpe ligneux étaient à peu près équivalentes.

En outre, ces essais ont approximativement indiqué les modalités de l'extraction, et nous ont ainsi permis, quand nous avons pu disposer de quantités importantes de matériel végétal, d'accéder plus rapidement aux génines brutes.

Source : MNHN, Paris

DEUXIÈME PARTIE

ISOLEMENT DES GÉNINES

A — Extraction — Hydrolyse

L'écorce et le bois des racines et des tiges sont séchés et pulvérisés.

La teneur en lipides de ce matériel s'étant révélée négligeable le traitement préalable par l'éther de pétrole a pu être évité.

L'extraction par le méthanol est faite en trois fois sur l'extracteur de Girard [6]. Entre chaque opération le matériel végétal est rebrassé de façon à assurer l'intégralité de l'extraction.

La solution alcoolique brun-sombre obtenue est évaporée à faible volume et diluée par l'eau. De l'acide chlorhydrique est ajouté en quantité telle que la normalité du mélange obtenu soit approximativement égale à 3 N. Puis la solution est soumise à l'hydrolyse par ébullition à reflux durant 4 h au bain-marie. Un solide noir et résineux se forme en abondance au cours de l'hydrolyse ; il représente la presque totalité de la fraction triterpénique.

Après refroidissement et dilution par l'eau, la partie liquide de l'hydrolysat est extraite par l'éther avec un rendement très faible ; la solution méthanolique du solide noir, diluée par l'eau, est à son tour traitée par l'éther avec un rendement beaucoup plus élevé. Les extraits éthérés sont réunis et lavés successivement par l'eau, la soude à 5% et par l'eau jusqu'à neutralité. La solution éthérée, d'abord brune, se décolore progressivement jusqu'au jaune pâle. Elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre.

L'évaporation du solvant laisse un résidu sec pesant environ 2% du matériel sec.

C'est à ce stade, lorsque nous avons pu disposer de l'extrait provenant de plusieurs kg de bois, que la complexité de la fraction triterpénique a commencé à nous apparaître.

Quels que soient les modes de cristallisation et les solvants essayés, quels que soient les dérivés recherchés, les cristaux, d'ailleurs souvent obtenus avec facilité, ne correspondaient pas à des substances pures, leur point de fusion variant de 220 à 240°, leurs analyses ne fournissant que des résultats approchés et leurs chromatogrammes restant très imprécis.

B. — Chromatographie sur papier

En l'absence de données suffisantes dans la littérature, nous avons dû mettre au point une technique de chromatographie sur papier qui nous

Source : MNHN, Paris

permette de suivre la purification de nos génines, de les différencier rapidement et, éventuellement, de les confronter à des substances de référence.

Après de nombreux essais infructueux, nous nous sommes arrêtés au système suivant :

Le papier WHATMANN n° 1 est préalablement imprégné avec une solution de formamide à 20% dans l'acétone, puis séché 10 mint. à l'air. Une goutte de la solution alcoolique de la substance à examiner est alors déposée sur la ligne de départ, puis le papier est de nouveau séché 5 mint. à l'air. Il est ensuite suspendu dans la cuve 1/2 h avant de commencer la chromatographie, pour l'imprégner des vapeurs du mélange développant.

La chromatographie ascendante est réalisée avec un mélange d'alcool isopropylique et d'acide acétique (99/1). Le chromatogramme est ensuite séché à fond à l'étude à 100° pour éliminer toute trace de formamide ; il est enfin révélé avec le réactif de NOLLER modifié.

Dans ces conditions, l'α-amyrine et la β-amyrine ont respectivement un Rf de 0,45 et de 0,50, tandis que nos substances donnent, à ce stade de la purification, une tache très etalée.

C. — Chromatographie sur alumine

Nous avons alors essayé la chromatographie preparative sur alumine (MERCK), dans divers systèmes de solvants, sur les fractions qui nous paraissaient les plus différenciées par leur point de fusion ou par leur type de cristallisation. Mais là encore, nous n'avons pu obtenir de substances pures, sinon en quantité trop faibles pour être étudiées utilement.

Un premier résultat plus précis a été obtenu grâce à la chromatographie sur alumine de la totalité de la fraction triterpénique provenant de 2 kg de matériel végétal.

La série d'éluants : benzène, éther, methanol, qui, après plusieurs tentatives, nous a semblé la meilleure, n'a pas permis une séparation rigoureuse des divers constituants triterpéniques, car l'élution se fait sans solution de continuité au passage d'une génine à l'autre, sauf en ce qui concerne la dernière dont l'elution nécessite un solvant beaucoup plus polaire que les autres. Néanmoins, le fractionnement très poussé de chacun des éluants nous a permis d'isoler, des fractions centrales de chacun d'eux, quatre génines différentes, et d'établir approximativement leur proportion relative à l'intérieur du mélange.

La totalité de la fraction triterpénique (10 g) provenant de 2 kg de bois, est redissoute dans 1 l de benzène et chromatographiée sur 1 kg d'alumine (MERCK) formant une colonne de 7 cm de diamètre sur 25 cm de hauteur. L'élution est faite par fractions de 100 ml.

Source : MNHN, Paris

Le tableau n° 1, ci-dessous, résume les résultats de cette chromatographie.

TABLEAU n° 1

Chromatographie sur alumine de 40 gr d'extrait brut

Solvants	*Numéro des fractions*	*Résidu sec*	*F du produit brut*	*Réactif de* NOLLER
Benzène	1 à 5	néant	—	—
	6 à 30	5 g gomme	—	négatif
	31 à 50	2 g semi-cristallin	155-162° A	rose
	51 à 64	1 g semi-cristallin	195-210° B	mauve
Benzène-Ether (9/1)	65 à 68	traces	—	—
	69 à 150	24 g semi-cristallin	220-235° C	lilas
Méthanol	151 à 155	traces	—	—
	156 à 175	7 g cristallin	288-295° D	ambré, puis rose

GÉNINE A.

La recristallisation dans l'éthanol du produit des fractions 31 à 50 fournit une substance se déposant en aiguilles courtes légèrement jaunes ; F 171-175° (microscope), 187° (banc) ; $[\alpha]_D^{21°} + 75{,}8°$ (c, 1,170) ; Rf 0,15 ; l'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{50}O$.

Trouvé		C	84,22	H	11,37
Calculé	%		84,44		11,81

GÉNINE B.

Le produit des fractions 51 à 64, recristallisé dans l'éthanol, donne des aiguilles incolores ; F 216-220° ; $[\alpha]_D^{22°} + 31°$ (c, 1, 0) ; Rf 0,58 ; l'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{50}O_2$.

Trouvé		C	81,33	H	11,17
Calculé	%		81,38		11,38

GÉNINE C.

La recristallisation, dans l'éthanol aqueux à 80% du produit des fractions 69 à 150 donne une substance cristallisant en longues aiguilles fines et incolores ; F variant de 230 à 238° (sublimation 200°) (microscope), et de 235 à 245° (banc) ; $[\alpha]_D^{20°} + 47{,}5°$ (c, 0,950) ; Rf 0,62 ; l'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé		C	78,56	H	10,84
Calculé	%		78,55		10,98

Source : MNHN, Paris

Génine D.

Le produit des fractions 156 à 175, recristallisé dans l'éthanol, donne des aiguilles courtes et incolores ; F 299-301° ; $[\alpha]_D^{23°}$ + 11° (c, 0,525, éthanol) et — 11° (c, 1,210, pyridine) ; Rf 0,67 ; l'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{48\text{-}50}O_4$.

Trouvé	C	76,06	76,15	H	10,03	9,87
Calculé %						
$C_{30}H_{48}O_4$		76,22			10,24	
$C_{30}H_{50}O_4$		75,90			10,62	

Les spectres infra-rouges des quatre génines présentent tous une large bande hydroxyle variant de 3,340 cm^{-1} à 3,380 cm^{-1} et une légère pointe correspondant à la double liaison, variant de 1,610 cm^{-1} à 1,630 cm^{-1}. Seul le spectre de la génine D possède une bande dans la région des carbonyles à 1,665 cm^{-1} avec un léger épaulement à 1,630 cm^{-1}.

Aucun des spectres ultra-violets ne montre d'absorption caractéristique, à part un léger maximum vers 210 mμ, correspondant sans doute à une double liaison.

Les quatre génines donnent une séquence colorée caractéristique avec le réactif de Liebermann, et une coloration rouge avec celui de Salkowski.

Toutes donnent une coloration jaune avec le tétranitrométhane.

Aucune ne forme de précipité avec la digitonine.

Enfin, les génines C et D donnent une coloration violette avec le di,ter-butyl-2,6-p-crésol.

Le tableau n° 2, ci-dessous, résume les caractéristiques principales de ces quatre alcools triterpéniques.

TABLEAU n° 2

Principales caractéristiques des quatre génines isolées

Génines	A	B	C	D
Formule brute	$C_{30}H_{50}O$	$C_{30}H_{50}O_2$	$C_{30}H_{50}O_3$	$C_{30}H_{48\text{-}50}O_4$
F	175°	216-220°	245°	299-301°
$[\alpha]_D$	+ 78°	+ 34°	+ 47°,5	+ 11° (éthanol) — 11° (pyridine)
Rf	0,45	0,58	0,62	0,65
% relatif au total des génines	6 %	3 %	70 %	20 %
% relatif au matériel végétal	0, 1 %	0,05 %	1,2 %	0,35 %

Source : MNHN, Paris

Les rendements beaucoup plus élevés des génines C et D nous ont engagé à approfondir davantage leur étude structurale, plutôt que celle des génines A et B, présentes en quantités beaucoup plus faibles.

Nous avons proposé le nom générique d'Armillari-génine pour ces quatre substances, dont aucune, à ce stade de notre travail, n'avait été identifiée à des triterpènes connus.

Sauf indication contraire, les pouvoirs rotatoires ont été pris dans le chloroforme au polarimètre Jobin et Yvon.

Les spectres infra-rouges ont été obtenus à la faculté de Pharmacie, dans le service de M. le professeur Guy (1), sur spectrophotomètre Baird, avec prisme NaCl et en suspension dans le Nujol.

Les spectres ultra-violets ont été faits au laboratoire, sur spectrophotomètre électronique Jobin et Yvon, en solution éthanolique.

Les analyses ont été faites au Laboratoire, par le service de micro-analyses (2).

Les points de fusion ont été pris sur banc et microscope Kofler.

(1) Nous sommes heureux de rendre hommage à la compétence et à l'amabilité de Mme Huguelle et de M. Hespel.

(2) Nous remercions Mlle M.-C. Jarreau, dont les qualités et la conscience professionnelles nous ont été d'un grand secours.

Source : MNHN, Paris

TROISIÈME PARTIE

IDENTIFICATION ET STRUCTURE

A. — Génine C

Au cours de la chromatographie de partage du mélange des génines, nous avons élué successivement, avec le benzène, les génines A et B. Avec le mélange benzène-éther (9/1) nous avons ensuite obtenu la fraction pondéralement dominante. On a vu, dans le chapitre précédent, que, malgré plusieurs recristallisations, la substance, obtenue en longues aiguilles fines, avait un point de fusion variant d'un lot à l'autre de 230 à 240°, après sublimation à 200°. L'analyse correspond avec exactitude, après séchage, à la formule brute $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé		C	78,56	78,48	H	10,84	10,79
Calculé	%		78,55			10,99	

Son spectre infra-rouge, qui possède une forte bande hydroxyle, ne montre aucune absorption dans la région des carbonyles.

L'acétylation pyridinée, réalisée à la température ordinaire, fournit, après 12 h de contact, des aiguilles incolores ; F 210-211° ; $[\alpha]_D^{20°}$ + 23° (c, 1,05), correspondant à la formule $[C_{30}H_{48}O]$ $(OCOCH_3)_2$.

Trouvé		C	75,10	H	10,08	
Calculé	%		75,23		10,03	

L'indice d'acétyle correspond également à un diacétate.

Trouvé		14,97	16,29	16,23
Calculé	%	15,48		
$(OCOCH_3)$				

Son spectre infra-rouge, en dehors des bandes à 1,710 cm^{-1}, 1,260 cm^{-1} et 1,230 cm^{-1}, correspondant aux acétyles, montre encore une bande hydroxyle, réduite mais très nette à 3,580 cm^{-1}.

Nous en avions déduit la présence d'un hydroxyle tertiaire.

Mais toutes les tentatives de déshydratation sont restées vaines ; la génine a été successivement traitée par l'acide sulfurique et par le mélange acide formique-acide sulfurique ; le dérivé acétylé a été traité par l'oxychlorure de phosphore et par l'acide formique. Dans aucun cas le diol diéthylénique cherché n'a été obtenu, seules les substances de départ ont été recueillies inchangées.

Par la suite, l'acétylation, réalisée dans les mêmes conditions, mais sur des quantités plus importantes, a mis en évidence des rendements

Source : MNHN, Paris

anormalement bas. Dans les cas les meilleurs, la fraction cristallisée représentait environ 30% du rendement théorique, le reste étant constitué par une substance gommeuse, réagissant fortement au réactif Noller, mais que nous n'avons pas pu faire cristalliser.

La chromatographie sur alumine de ce reste, redissous dans le benzène, a provoqué l'élution d'une fraction supplémentaire du diacétate, déjà isolé, et d'une deuxième substance de point de fusion plus élevé, 230-239°, puis après plusieurs recristallisations dans le méthanol 257-260°, $[\alpha]_D^{22°}$ + 3,5° (c, 0,985). L'analyse correspond à la formule $[C_{30}H_{48}O]$ $(OCOCH_3)_2$.

Trouvé		C	75,15	H	10,10
Calculé	%		75,23		10,03

L'indice d'acétyle correspond aussi à un diacétate.

Trouvé		16,30	15,14
Calculé	%		15,48
$(OCOCH_3)$			

Son spectre infra-rouge, en plus des bandes des acétyles à 1,710 cm^{-1}, 1,680 cm^{-1}, 1,270 cm^{-1} et 1,230 cm^{-1}, montre encore une bande hydroxyle à 3,410 cm^{-1}, donc nettement déportée vers les faibles longueurs d'onde, par rapport à la bande correspondante du premier diacétate.

Nous avons alors examiné et essayé de préciser l'influence des variations des conditions de l'acétylation ce qui nous a permis d'observer les faits suivants.

A) Dans un premier essai, l'acétylation pyridinée de 18 g de génine C a été conduite, toujours à la température ordinaire, mais en portant le temps de contact à 36 h au lieu de 12 h. Le précipité (23 g), obtenu de la manière habituelle, a été redissous dans le benzène et directement chromatographié sur 600 g d'alumine (Merck)

Dans ces conditions, la séparation du mélange très complexe résultant de la réaction n'a pu être obtenue qu'après trois chromatographies successives.

1° Dans la première, c'est la totalité de la solution benzénique du précipité qui est passée sur la colonne.

Le benzène élue 1,5 g du diacétate (I), F 211°.

Le mélange benzène-éther (19/1) élue une quantité considérable d'une substance gommeuse qui n'a pu être cristallisée.

Le mélange benzène-éther-méthanol (11/8/1) élue 1,5 g ; du diacétate (IV), F 257-260°.

2° La substance gommeuse incristallisable, est reprise dans l'éther de pétrole qui ne la dissout que partiellement. Après essorage de l'insoluble, la solution est chromatographiée sur 150 g d'alumine.

L'éther de pétrole n'élue rien.

Le mélange éther de pétrole-benzène (19/1) élue 0,5 g d'une substance (III)

Source : MNHN, Paris

F 212-214°, qui, après cristallisation dans l'éthanol, donne des gaillieus incolores, F 216-217°, $[\alpha]_D^{21°}$ + 53° (c, 1,089), abaissant à 200° le point de fusion du diacétate 1. L'analyse correspond à la formule $[C_{31}H_{48}](OCOCH_3)_2$.

Trouvé		C	77,75	77,79	H	10,05	10,39
Calculé	%		77,52			10,33	

L'indice d'acétyle correspond également à celui d'un diacétate.

Trouvé		15,74	16,88
Calculé $(OCOCH_3)$	%	15,95	

Son spectre infra-rouge ne présente aucune absorption dans la région des hydroxyles, mais seulement dans celles des acétyles à 1,720 cm.-1, 1,240 cm.-1, 1,220 cm.-1.

Le même mélange élue ensuite 6 g d'une fraction semi-cristalline (II), qui nous a d'abord paru correspondre à un mélange du fait de son point de fusion très étalé, 140-150°, après décomposition vers 100°. Mais sa recristallisation dans l'éthanol donne des aiguilles épaisses, F 110° et 156-157°, $[\alpha]_D^{20°}$ -12° (c, 1,337). Son analyse correspond à la formule : $[C_{30}H_{47}](OCOCH_3)_3$.

Trouvé		C	73,83	H	9,87	
$[C_{30}H_{47}](OCOCH_3)_3$ Calculé	%		73,93		9,67	

L'indice d'acétyle correspond à celui d'un triacétate.

Trouvé		21,1	20,85
Calculé $(OCOCH_3)$	%	21,56	

Son spectre infra-rouge ne montre plus d'absorption dans la région des hydroxyles, seules apparaissent les bandes des acétyles à 1,725 cm.-1, 1,240 cm.-1, et 1,220 cm.-1.

Le mélange éther de pétrole-benzène-éther (8/1/1) élue 2,5 g du diacétate IV.

3° L'insoluble dans l'éther de pétrole est dissous dans le benzène et chromatographié sur 150 g d'alumine.

Le benzène n'élue rien.

Le mélange benzène-éther (9/1) élue 0,5 g du diacétate 1.

Les mélanges benzène-éther (1/1) et benzène-éther-méthanol (5/4/1) élquent 6 g du diacetate IV.

Source : MNHN, Paris

Le tableau n° 3, ci-dessous, groupe les principales caractéristiques des quatre acétates.

TABLEAU n° 3
Principales caractéristiques des acétates : I, II, III, et IV.

N° des acétates	*F*	$[\alpha]_D$	*Rendement à partir de 23 g de précipité*	
Di-acétate I	211°	+ 23°	2 g	10,8 %
Tri-acétate II	155-156 déc. 110°	- 12°	6 g	32,4 %
Di-acétate III	214-216	+ 53°	0,5 g	2,7 %
Di-acétate IV	257-260	+ 3°5	10 g	54 %

B) Au cours d'un deuxième essai, 2 g de génine C ont été traités à reflux pendant 2 h, en solution dans la pyridine et l'anhydrine acétique à 110-120° sur bain métallique.

Le précipité (2,41 g), obtenu par dilution aqueuse, a été redissous dans l'ether de pétrole et chromatographié sur 50 g d'alumine.

Les mélanges éther de petrole-benzène (19/1) et éther de pétrole-benzène-éther (13/1/6) élnent 1,870 g du triacétate II.

L'éther et le mélange éther-méthanol (19/1) élnent 110 mg d'une substance gommeuse qui, n'ayant pu être cristallisée, a été réacétylée dans les mêmes conditions et rechromatographiée sur 20 g d'alumine.

Le mélange éther de petrole-benzène-éther (5/1/4) élue successivement 240 mg du triacétate II et 50 mg du diacétate III.

Dans ces conditions, le rendement du triacétate II est donc passé de 32,4% à 86,5%, alors que celui du diacétate III restait du même ordre de grandeur, 2%, tandis que les diacétates I et IV avaient complètement disparu.

Il paraissait alors plausible d'admettre que les diacétates I et IV et le triacétate II provenaient de la même genine, tandis que le diacétate III pouvait avoir une origine différente.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé d'une part à la réacétylation vigoureuse de chacun des trois diacétates et, d'autre part à la saponification des quatre dérivés acétylés.

a) La reacétylation pyridinée, par ébullition à reflux pendant 2 h, donne les résultats suivants :

1° Avec le diacétate I, F 211-213°, nous avons obtenu un corps cristallisé en aiguilles épaisses, F 151-155°, $[\alpha]_D$ 21°-11,5° ne déprimant pas le point de fusion du triacétate II.

Source : MNHN, Paris

2° Le diacétate III, F 214-216, est intégralement réeupéré inchangé.
3° Le diacétate IV F 257-260°, forme un corps cristallisé en aiguilles épaisses, F 152-155° $[\alpha]_D^{20}$ -12°, ne déprimant pas le point de fusion du triacétate II.

b) La saponification des quatre dérivés acétylés, par ébullition à reflux pendant 2 h dans une solution méthanolique de potasse à 5%, confirme les résultats de l'acétylation.

1° Le diacétate I libère une substance cristallisée en aiguilles fines, F 245° (sublimation à 200°), $[\alpha]_D^{21}$ + 47° dont l'analyse correspond à la formule : $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé		C	78,60	H	10,88
Calculé	%		78,55		10,99
$C_{30}H_{50}O_3$					

n'abaissant pas le point de fusion de la génine C.

2° Le triacétate II libère une substance cristallisée en aiguilles fines, F 245°, (sublimation à 200°), n'abaissant pas le point de fusion de la génine C, et dont l'analyse correspond à la formule : $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé		C	78,48	H	11,0
Calculé	%		78,55		10,99

3° Le diacétate III fournit une substance cristallisée en aiguilles fines, F 242° (sans sublimation), abaissant à 230-235° le point de fusion de la génine C et des corps provenant de la saponification des acétates I, II et IV $[\alpha]_D^{20}$ + 35° (c, 1,050), dont l'analyse correspond à la formule $C_{30}H_{50}O_2$.

Trouvé		C	81,58	H	11,19
Calculé	%		81,39		11,38

4° Le diacétate IV libère une substance cristallisée en aiguilles fines, F 241° (sublimation 200°), n'abaissant pas le point de fusion de la génine C, $[\alpha]_D^{20}$ + 48°, dont l'analyse correspond à la formule $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé		C	78,59	H	10,84
Calculé	%		78,55		10,99

Le tableau n° 4 résume les résultats de la réacétylation et de la saponification.

Source : MNHN, Paris

TABLEAU n° 4

Résultats de la réacétylation et de la saponification des 4 dérivés acétylés

Acétates	*Produits de la réacétylation*	*Produits de la saponification*
I 211-213°	triacétate II, F 154-155°	$C_{36}H_{56}O_3$, F. 245° (subl. 200°)
II 155-156°	—	$C_{30}H_{50}O_3$, F. 245° (subl. 200°)
III 214-216°	inchangé	$C_{30}H_{48}O_3$, F. 242° (sans subl.)
IV 257-260°	triacétate II, F 152-155°	$C_{36}H_{56}O_6$, F. 244° (subl. 200°)

Il apparaissait donc que, sous certaines conditions, la génine C pouvait donner naissance à trois dérivés acétyles différents. La différence de réactivité de ses trois groupements hydroxyles, en même temps que leur nature primaire ou secondaire, étaient ainsi mises en évidence, tandis que la présence de la bande hydroxyle, subsistant dans les spectres infra-rouges des diacétates I et IV, était interprétée.

D'autre part, l'isolement du diacétate III et du diol qu'il libère, par saponification, montrent que la génine C avait été, jusque-là contaminée par une deuxième génine, probablement la génine B, que, ni les recristallisations répétées, ni la chromatographie sur alumine n'avaient permis de séparer complètement.

Le point de fusion très proche des deux génines et le relativement faible abaissement causé par leur mélange, nous avaient longtemps induit en erreur au cours du travail d'isolement.

Jusqu'à cette étape de notre travail nous n'avions pu identifier la génine C à l'un des triols décrits dans la littérature. Mais à la lumière des derniers résultats, et grâce à la purification plus poussée de notre génine, nous avons pu reprendre cette comparaison avec plus de netteté.

Parmi les triols triterpéniques décrits, trois seulement, le soyasapogénol B, la longispinogénine et la primulagénine A, n'étaient pas trop éloignés du nôtre.

Nous avons éliminé successivement :

1° Le soyasapogénol B [8] [9], qui est un tri-hydroxy-3β, 16β, 23-oléana 12-ène, F 260°, $[\alpha]_D$ + 92°, formant un triacétate, F 180°, $[\alpha]_D$ + 83°, dont les constantes physiques, surtout celles du dérivé acétylé, sont très éloignées de celles de nos corps.

2° La longispinogénine [10], qui est un trihydroxy-3β, 16β, 28-oléana 12-ène, F 247-249°, $[\alpha]_D$ + 53°, formant un triacétate, F 219-221°, $[\alpha]_D$ + 73°. Les constantes de la génine sont très proches de celles de la nôtre, mais celles du triacétate diffèrent beaucoup de celles de notre dérivé correspondant.

Par contre, la primulagénine A, isolée par A. Margot et T. Reichstein [11] à partir de *Primula elatior*, et retrouvée par L. Ruzicka et ses Collaborateurs [12] au cours de leur travail sur l'acide échinocystique, semblait maintenant pouvoir être identifiée à la génine C. Non seulement les constantes physiques des deux substances sont très proches, mais la génine de

Source : MNHN, Paris

Reichstein, comme la nôtre, forme trois dérivés acétylés qui pouvaient s'apparenter aux dérivés correspondants de la génine C.

Nous avons pu vérifier l'exactitude de cette hypothèse grâce à la grande obligeance du Professeur T. Reichstein qui nous a fait parvenir des échantillons des primulagénines A et B et d'un de leurs diacétates respectifs.

1° La génine C n'abaisse pas le point de fusion de la primulagénine A.

2° Le diacétate I n'abaisse pas celui du diacétate de référence.

3° Par réacetylation de ce dernier, nous avons obtenu le triacétate de la primulagénine A, dont le point de fusion n'est pas abaissé par le triacétate II.

4° Enfin, les spectres infra-rouges des corps de référence, et tout particulièrement ceux des dérivés acétylés, sont en excellent accord avec les spectres de nos substances correspondantes.

Comme la génine C, la primulagénine A est contaminée par une deuxième génine, la primulagénine B, de point de fusion presque identique, et formant aussi un diacétate très proche. Mais, là s'arrête la similitude, la primulagénine B et son diacétate ont leurs points de fusion respectifs très abaissés par la génine B et son diacétate. Leurs spectres infra-rouges présentent des différences notables.

Le tableau n° 5 établit la comparaison des constantes physiques de la primulagénine A, de la génine C et de leurs dérivés acétylés respectifs.

TABLEAU n° 5

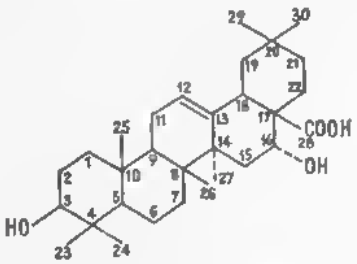
Comparaison des constantes de la primulagénine A, de la génine C et de leurs dérivés acétylés

Substance	*F*	$[\alpha]_D$
Primulagénine A	248-250° (sublim. 200°)	+ 55°
Génine C	245° (sublim. 200°)	+ 47°5
3β, 16α, 28 — triacétate de référence	153-160° (déc. 110°)	— 9°7
Triacétate II	155-156° (déc. 110°)	— 12°
3β, 16α — diacétate de référence	266°	— 2°2
Diacétate IV	257-260°	+ 3°5
3β, (ou 16α), 28 — diacétate de référence	213-221°	+ 31°
Diacétate I	211-213°	+ 25°

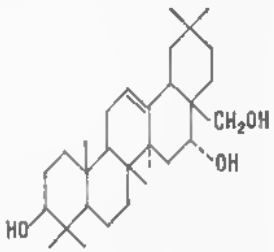
Pour obtenir une preuve supplémentaire de la structure de notre génine, nous avons choisi de refaire la série de réactions utilisées par Ruzicka et ses collaborateurs dans leur étude structurale de l'acide échinocystique, et au cours de laquelle ils ont isolé un triol qui a été ultérieurement identifié à la primulagénine A par Bischof et Jeger [13].

Source : MNHN, Paris

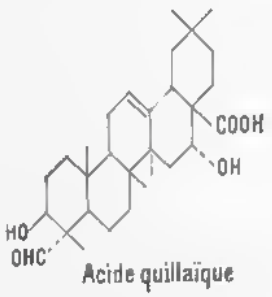
La détermination de la structure de l'acide échinocystique a été d'une grande importance dans la chimie des triterpènes, car elle a fourni la preuve de la constitution de la primulagénine A, du maniladiol et de l'acide quillaïque.



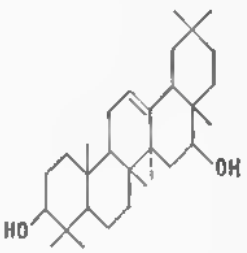
Acide échinocystique



Primulagénine A



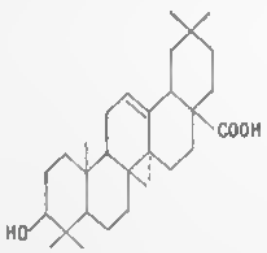
Acide quillaïque



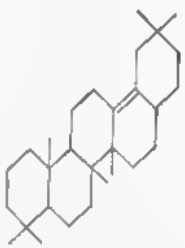
Maniladiol

Cette détermination a été l'aboutissement des longues recherches de plusieurs équipes de chercheurs.

a) Dans une première étape, Nollier et ses collaborateurs [14 à 21] ont montré que les deux hydroxyles de l'acide échinocystique étaient secondaires, que le moins réactif des deux était en position β par rapport au carboxyle et que la double liaison n'était pas en position α ou β par rapport aux deux hydroxyles. Enfin, par l'obtention de l'« Oléanène III » [22], les auteurs l'ont apparenté à l'acide oléanolique appartenant au groupe de la β-amyrine.



Acide Oléanolique



Oléanène III

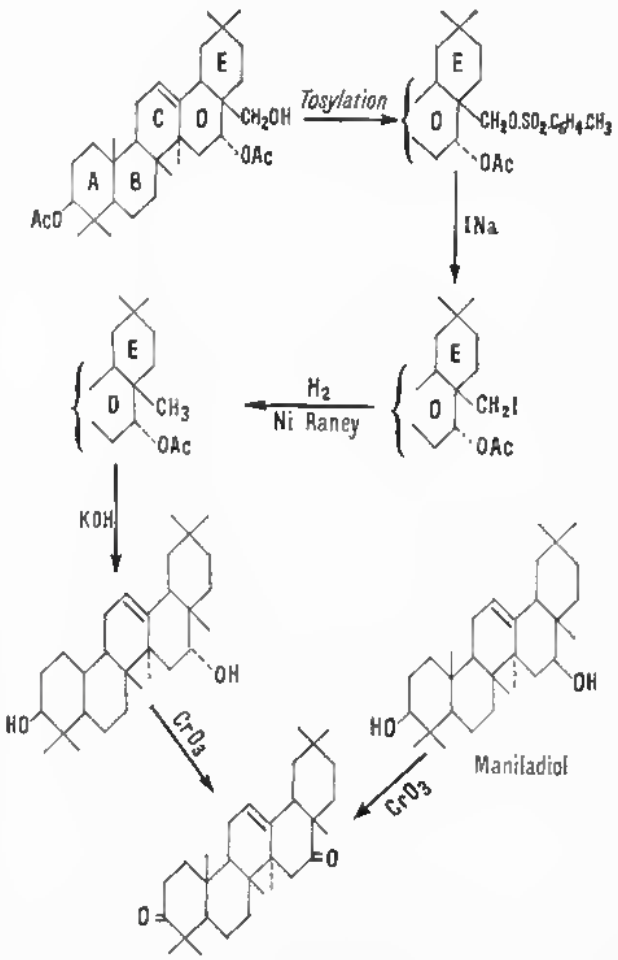
b) Kon et ses collaborateurs [23 à 28], dans un travail parallèle sur l'acide quillaïque, qui est un aldéhydo-hydroxy acide, ont montré que

Source : MNHN, Paris

l'acide desoxy-quillaique est identique à l'acide échinocystique et l'ont également raccordé à l'acide oléanolique par l'obtention d'un noroléan-17, 18-ène.

c) Puis Frazier et Noller [20] obtiennent, à partir de l'acide échinocystique, un oléanate de méthyle et son acétate, prouvant ainsi que l'un des hydroxyles est en position 3 équatoriale, et que le carboxyle est rattaché en 17.

d) Enfin, Ruzicka et ses collaborateurs [12] [29] [30] [31], établissent définitivement la structure de l'acide échinocystique et montrent sa parenté avec le maniladiol, en convertissant le carboxyle en méthyle.



1° Par une première voie, le diacétate de l'acide échinocystique est converti en chlorure d'acide, puis en ester thiolméthylénique, qui, par

Source : MNHN, Paris

réduction, donne le diacétate d'un triol (notre diacétate IV), dont la saponification libère ce triol qui a été identifié à la primulagénine A.

Le diacétate du triol forme un dérivé tosylé, qui, après transformation en iodure, conduit au diacétate d'un diol.

2° Par une deuxième voie, la réduction de Rosenmund transforme le chlorure d'acide en aldéhyde, lequel est à son tour réduit, selon la technique de Wolff-Kishner, pour aboutir au même diol que ci-dessus.

Ce diol n'est pas identique au maniladiol, mais donne, par oxydation chromique, une dicétone identique à celle préparée à partir du maniladiol.

Les deux diols ne diffèrent donc que par la configuration du groupe hydroxyle fixé en 16. Équatorial dans le maniladiol, il doit donc être axial dans le diol obtenu par dégradation de l'acide échinocystique.

C'est la première suite de réactions, utilisée par Ruzicka, que nous avons tenté de reproduire.

Le diacétate IV, F 257-260°, est traité par le chlorure de p-toluènesulfonyle dans le benzène absolu et la pyridine sèche, soit à la température ordinaire, soit par ébullition à reflux. Dans les deux cas, on obtient une substance cristallisée en aiguilles incolores, F 193-195° (Ruzicka et Coll. 194-195°5). L'analyse correspond à la formule $C_{41}H_{60}O_7S$.

Trouvé		C	70,81	H	8,72
Calculé	%		70,65		8,68
$C_{41}H_{60}O_7S$					

Le tosylate est chauffé en tube scellé en présence d'iodure de sodium ; après plusieurs recristallisations, on obtient des aiguilles incolores, F 234-236° (Ruzicka et Coll. : 229-230°).

L'analyse correspond à la formule $C_{34}H_{50}O_4I$.

Trouvé		C	62,51	H	8,34
Calculé	%		62,56		8,19

La réduction de l'iodure et la saponification du produit résultant n'ayant donné que des rendements très faibles, nous n'avons pu ni purifier davantage le diol obtenu, ni procéder à son oxydation.

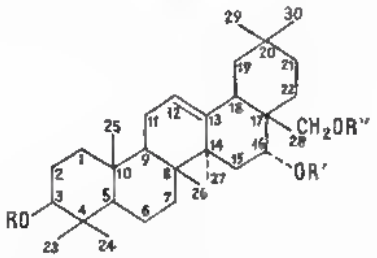
Néanmoins, l'identité des résultats des premières étapes s'ajoutant à la comparaison avec les substances de référence de Rubinstein, nous permet de conclure à l'identité de la génine C avec la primulagénine A.

La génine C est donc un diol triterpénique du groupe de la β-amyrine et défini comme : un trihydroxy-3β, 16α, 28-oléana-12-ène [11] [12].

Il s'en suit donc que le triacétate II est un triacétoxy-3β,16α,28-oléana-12-ène ; tandis que le diacétate I est un hydroxy-16 α(ou 3β)-diacétoxy-3β(ou 16α), 28-oléana-12-ène [11] [12] [13], et que le diacétate IV est un hydroxy-28-diacétoxy-3β,16α-oléana-12-ène [11] [12] [13].

Génine C,	R = R' = R'' = H
Triacétate II,	R = R' = R'' = Ac
Diacétate I,	R = Ac (ou H), R' = H (ou Ac), R'' = Ac
Diacétate IV,	R = R' = Ac, R'' = H

Source : MNHN, Paris



Nous avons suivi les règles de la nomenclature établies par Mme S. Alland et G. Ourisson dans le tome des constantes sélectionnées concernant les triterpénoïdes.

Cet ouvrage nous a été d'un grand secours au cours de nos essais d'identification.

Pour terminer, nous ajouterons que les considérations d'ordre biogénétique, concordent avec ces résultats. Si la primulagénine A a été trouvée dans une primulacée, la génine C a été isolée d'une myrsinacée, famille qui, dans le classement systématique des phanérogames, est immédiatement voisine de celle des primulacées.

***

B. — Génine D

La génine D est obtenue tout à la fin de la chromatographie de partage de l'extrait triterpénique brut.

C'est le seul de ses constituants qui puisse être aisément séparé des autres génines, car son élution complète n'est obtenue que par le lavage de la colonne par le méthanol.

Plusieurs cristallisations dans l'éthanol donnent la génine pure, en aiguilles courtes fondant à 299-301°.

Sa solubilité dans l'éthanol est faible, à peu près nulle dans la plupart des autres solvants organiques, sauf dans le dioxane, la pyridine et le diéthylèneglycol.

Avec le réactif de Liebermann, elle donne la série de couleurs suivantes : rose, violet, bleu, vert, ombré.

Dans le réactif de Salkowski, sa solution est rouge brun, tandis qu'avec le di,ter-2,6-butyl-p-crésol elle forme une coloration violette.

Elle ne fournit pas de précipité avec la digitonine.

Son insolubilité dans le chloroforme gêne la réaction avec le tétranitrométhane, mais son acétate donne une coloration jaune très nette qui révèle l'insaturation de la molécule.

Source : MNHN, Paris

Pour la même raison, son poids moléculaire a été calculé sur son dérivé acétylé, selon la méthode cryoscopique de Beckmann.

P.M. théorique = 601, trouvé =630,615.

L'analyse de la génine correspond à la formule brute $C_{30}H_{48}O_4$.

Trouvé		C	76,05	H	9,96
Calculé	%		76,22		10,24
$C_{30}H_{48}O_4$					

L'examen de son spectre infra-rouge montre une bande carbonyle à 1,665 cm^{-1}, avec un léger épaulement à 1,630 cm^{-1} (correspondant probablement à une double liaison) et une bande hydroxyle à 3,400 cm^{-1}.

a) Groupements oxygénés.

L'acétylation pyridinée fournit, après 36 h de contact, un corps cristallisé en plaquettes, F 206-208°, $[\alpha]_D^{20}$ — 35° (c, 1,075), dont l'analyse correspond à la formule $[C_{30}H_{46}O]\ (OCOCH_3)_3$.

Trouvé		C	72,24	H	8,97
Calculé	%		72,21		9,09

L'indice d'acétyle correspond également à un triacétate.

Trouvé		19,22	19,47
Calculé	%	20,94	
$(OCOCH_3)$			

Ce résultat implique l'existence de trois groupements hydroxyles primaires ou secondaires.

Le traitement de la génine D par la 2,4-dinitro-phényl-hydrazine donne aisément l'hydrazone correspondante en cristaux jaunes orangés, F 255-256°, dont l'analyse conduit à la formule brute $C_{36}H_{54}O_7N_4$.

Trouvé		C	65,86	H	8,30	N	8,63
Calculé	%		66,03		8,31		8,56

L'existence du groupement carbonyle était ainsi confirmée, en même temps que le quatrième oxygène était caractérisé.

b) Double liaison.

Le traitement de l'acétate de la génine D par le perhydrol, en milieu acétique, aboutit, après reflux de 2 h, à l'époxyacétate, F 233-237°, incolore avec le tétranitro-méthane, et dont l'analyse répond à la formule brute $C_{36}H_{54}O_8$.

Trouvé		C	70,64	H	8,97
Calculé	%		70,32		8,85

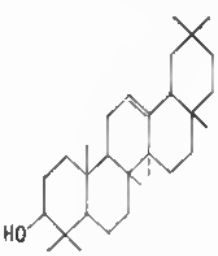
Source : MNHN, Paris

La saponification de ce corps, par la potasse méthanolique à 5%, libère l'époxyde de la génine D, F 262-263°, dont l'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{48}O_5$.

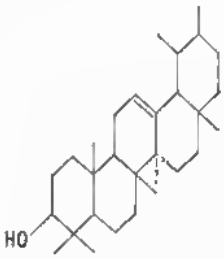
Trouvé		C	73,68	H	9,64
Calculé	%		73,72		9,90
$C_{30}H_{48}O_5$					

La double liaison, qui, jusqu'ici, n'avait été décelée que par la réaction positive de l'acétate avec la tétranitrométhane, par un léger épaulement à 1,630 cm^{-1} dans l'infra-rouge et par une faible absorption à 210 μ dans l'ultra-violet, est confirmée par l'obtention de ce dérivé.

D'autre part, la facilité d'obtention de l'époxyde tend à faire entrer la génine D dans le groupe de la β-amyrine, car on sait que la double liaison des triterpènes du groupe de l'α-amyrine est beaucoup plus inerte, et qu'elle ne se laisse oxyder que par les peracides [32].



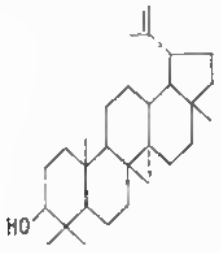
β-Amyrine



α-Amyrine

c) Hydrogénation catalytique.

Enfin, sa résistance à l'hydrogénation catalytique en présence de charbon palladié, sous pression et à 150°, exclut l'hypothèse d'une double liaison extra nucléaire et son appartenance au groupe du lupéol.



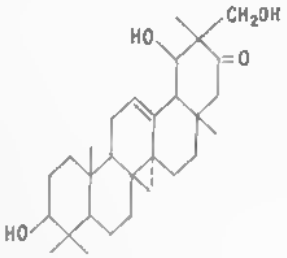
Lupéol

Pour une formule brute $C_{30}H_{48}O_4$, la génine D possède donc trois groupements hydroxyles, primaires ou secondaires, un groupement carbonyle cétonique ou aldéhydique, et une double liaison éthylénique que son comportement à l'hydrogénation catalytique et la similitude avec les corps de cette série pouvaient fixer en 12,13. En nous référant à sa réaction positive

Source : MNHN, Paris

avec le di,ter-2,6-butyl-p-crésol et au résultat obtenu en appliquant la formule de Frèrejacque [33] pour le calcul de la condensation d'une molécule organique, nous pouvions admettre que la génine D était pentacyclique.

Le seul triol triterpénique connu possédant un groupement carbonyle est la gratiogénine (34). La génine D en diffère à la fois par ses constantes et par celles de ses dérivés.



Gratiogénine (formule probable)

Pour tenter de raccorder notre génine à un triterpène connu, il fallait modifier le nombre ou la nature de ses groupements oxygénés. Le point d'attaque le plus vulnérable nous paraissant être le carbonyle, deux moyens d'action se présentaient alors, d'une part, sa réduction en groupement méthylène ou en groupement méthyle pour aboutir à un triol, d'autre part, son hydrogénation en groupement alcool, primaire ou secondaire pour nous conduire à un tétrol.

Auparavant, nous avons essayé d'élucider la nature du groupement carbonyle par oxydation chromique de l'acétate et de la génine, en vue de vérifier la présence éventuelle d'un groupement aldéhydique.

a) Oxydation chromique.

1° L'acétate de la génine D est oxydé en milieu acétique, par l'anhydride chromique, en chauffant à reflux à 160° pendant 1 h 1/2. Le produit de la réaction est recristallisé dans le méthanol avec un rendement presque quantitatif, F 145° resolidification, F 214-216°. L'analyse est en accord avec la formule $[C_{30}H_{43}O_2]$ $(OCOCH_3)_3$.

Trouvé		C	70,63	H	8,71
Calculé	%		70,55		8,55

Son spectre ultra-violet montre un maximum très net à 245 mμ, absorption caractéristique des cétones en α d'une double liaison [11] [35].

De plus, ses réactions avec le tétranitrométhane et avec le réactif de Liebermann sont négatives, alors qu'elles étaient toutes deux positives avec l'acétate de départ.

Ces deux faits sont caractéristiques également des cétones insaturées [5]. Nous pouvions donc admettre avoir oxydé le $-CH_2-$ en 11, voisin de la double liaison.

Source : MNHN, Paris

L'extraction par l'éther, des lavages alcalins, réacidifiés, donne un résultat totalement négatif.

2° L'oxydation chromique de la génine libre conduit à des rendements beaucoup plus faibles, ce qui est probablement dû au nombre de groupements susceptibles de réagir, et au mélange très complexe qui résulte de la réaction. Néanmoins, ici également, la fraction neutre prédominant de façon considérable, nous avons pu en isoler quelques mg d'une substance en cristaux légèrement jaunes, F ~250°, dont l'analyse concordait avec la formule brute $C_{30}H_{44}O_4$.

Trouvé		C	76,89	H	9,35
Calculé	%		76,88		9,46
$C_{30}H_{44}O_4$					

Son spectre ultra-violet montre un maximum à 275 mμ.

Ce corps, compte tenu des résultats ultérieurs, correspond probablement à une tricétone aldéhydique.

L'absence de la fraction acide, que nous aurions dû obtenir dans les deux cas si le carbonyle de la génine D avait été aldéhydique, nous conduit à penser que celle-ci était une trihydroxy-cétone.

Nous pouvions également éliminer la position 11, comme emplacement du groupement cétonique initial ; ce qui est d'ailleurs confirmé par la réaction positive de la génine ou de son acétate avec le réactif de Liebermann et avec le tétranitrométhane.

b) Réduction de la génine D.

La réduction de la génine, par la méthode de Wolff-Kishner, modifiée par Huang-Minlon [36], donne, après chromatographie et recristallisation dans l'éthanol à 80% une substance cristallisée en longues aiguilles fines et incolores, F 215°, $[\alpha]_D^{22°}$ + 18°, dont l'analyse concorde avec la formule brute $C_{30}H_{50}O_3$.

Trouvé		C	78,53	H	11,03
Calculé	%		78,55		10,99
$C_{30}H_{50}O_3$					

Elle n'abaisse pas le point de fusion de la génine C, et les spectres infra-rouges des deux substances sont absolument identiques.

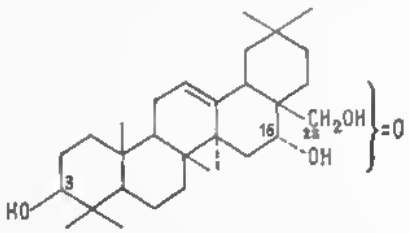
L'acétylation pyridinée fournit, après 12 h de contact à la température ordinaire, un corps cristallisé en aiguilles, F 210-211°, répondant à la formule $[C_{30}H_{50}O]$ $(OCOCH_3)_2$.

Trouvé		C	75,36	H	9,75
Calculé	%		75,23		10,03

Il n'abaisse pas le point de fusion du diacétate I de la génine C. Il fournit par, acétylation plus vigoureuse, le triacétate II de la génine C. Enfin, son spectre infra-rouge est identique à celui du diacétate I.

Source : MNHN, Paris

L'étude de la génine C, menée parallèlement nous ayant permis de l'identifier à la primulagénine A, l'emplacement et la nature des trois groupements hydroxyles de la génine D, que nous venions de lui raccorder, étaient donc fixés et sa formule établie, à la position du groupement carbonyle près. La génine D peut donc être définie comme un trihydroxy-3β, 16α, 28-oxo-x-oléana-12-ène.



Génine D (formule approchée)

c) Hydrogénation de la génine D.

La méthode d'hydrogénation qui nous a donné les meilleurs résultats, pour la génine D, est celle de Paul [37], avec le borohydrure de potassium et le chlorure de lithium. Elle nous a donné des rendements très supérieurs à ceux donnés par l'hydrure de lithium et d'aluminium et par le borohydrure de potassium seul.

La substance résultant de cette réaction est encore moins soluble que la génine D dans la plupart des solvants organiques, sauf dans la pyridine et le dioxane, mais sa cristallisation y est très lente et difficile. C'est pourquoi nous avons préféré passer par son acétate, qui, par saponification alcaline, libère la génine, sous forme cristalline, au sein même de la solution de potasse méthanolique.

Les micro-cristaux en aiguilles, obtenus de cette manière, fondent à 300-302°, et abaissent le point de fusion de la génine D à 290-292°. Ce point de fusion très proche et cette dépression relativement faible pouvaient faire penser à une simple récupération du corps de départ. Par contre le dérivé acétylé du produit de l'hydrogénation diffère nettement du triacétate de la génine D, 238-239°, le point de fusion du mélange des deux dérivés acétylés étant abaissé à 125-180°.

De plus, les analyses concordent, d'une part, avec la formule d'un tétrol en $C_{30}H_{50}O_4$.

Trouvé		C	75,74	H	10,78
Calculé	%		75,90		10,62
$C_{30}H_{50}O_4$					

D'autre part, avec la formule d'un tétracétate en $[C_{30}H_{46}](OCOCH_3)_4$.

Trouvé		C	70,64	H	9,14
Calculé	%		70,99		9,09

Source : MNHN, Paris

Enfin, le spectre infra-rouge de la génine hydrogénée ne présente plus aucune absorption dans la région des carbonyles, alors que la bande hydroxyle est considérablement élargie et légèrement déportée vers les faibles longueurs d'onde, 3,330 cm^{-1} au lieu de 3,380 cm^{-1}.

Pour éliminer toute possibilité d'acétylation incomplète de la génine D, nous l'avons réacétylée dans les conditions utilisées pour l'acétylation de la substance hydrogénée, et nous n'avons, de nouveau, isolé que le triacétate initial.

Pas plus que la génine D, ce nouveau tétrol n'a pu être identifié à un triterpène connu.

Les triterpènes tétra-hydroxylés connus sont peu nombreux. A l'heure actuelle ont été décrits :

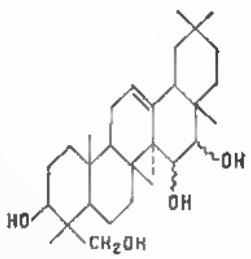
1° Le folientétrol (38) qui appartient au groupe du lupéol ;

2° Le sojasapogénol A (39) qui est un tétrahydroxy-3β, 15α, 16α, 24-oléana-12-ène ;

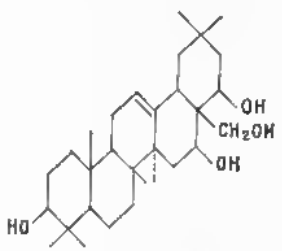
3° Le barringtogénol (40) qui est un tétrahydroxy-2α, 3β, 23, 28-oléana-12-ène ;

4° La chichipigénine (41) qui est un tétrahydroxy-3β, 16β, 22α, 28-oléana-12-ène.

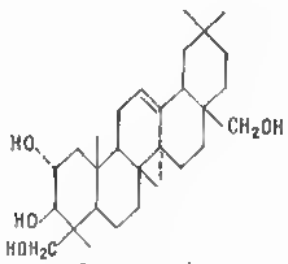
Les trois derniers appartiennent au groupe de la β-amyrine, mais tous diffèrent de notre tétrol par leurs constantes physiques, par la position ou par l'orientation d'un ou de plusieurs de leurs groupements hydroxyles.



Soyasapogénol A



Chichipigénine



Barringtogénol

d) Position du groupement cétonique.

Si le groupement cétonique est voisin d'un $-CH_2-$ le choix de sa position se trouve considérablement restreint. Pour nous en assurer, nous avons utilisé le perbromure de triméthyl-phényl-ammonium, réactif de Jacques

Source : MNHN, Paris

[43], qui permet la bromuration sélective du groupe -CO-CH_2- en -CO-CH Br- et qui a été appliqué avec succès par Brule [44] à la série des flavones.

Une première tentative sur la génine D ne nous a pas donné le résultat escompté. L'analyse du composé obtenu a fourni un pourcentage de brome ne correspondant ni à un dérivé mono-bromé ni à un dérivé di-bromé, mais assez exactement à un intermédiaire, comme si la double liaison avait partiellement réagi, conduisant à la formation des deux bromures.

Le deuxième essai, réalisé sur l'époxyde de la génine D, a été beaucoup plus concluant. Grâce à la suppression de la double liaison, le seul groupement encore susceptible de réagir est le méthylène voisin du groupement cétonique. La substance cristalline obtenue fond à 269-270° et abaisse le point de fusion de l'époxyde à 248-252°. L'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{17}O_5Br$.

Trouvé		C	63,40	H	8,49	Br	14,62
Calculé	%		63,47		8,34		14,07

L'obtention de ce dérivé rend donc évidente l'existence d'un groupement -CO-CH_2-. Or, un tel groupement ne peut trouver place dans le squelette de la génine D que dans le noyau A en 1 ou 2, dans le noyau B en 6 ou 7, et dans le noyau E en 21 ou 22.

Le tétrol, obtenu précédemment par réduction du groupe -CO-, n'a pu être identifié à aucun des tétrols de cette série déjà décrits ; par contre, il fournit une réaction positive avec la p-nitraniline, réactif utilisé par Fnèrejacque [42] pour détecter les groupements 1,2-glycol dans les glucosides digitaliques. On dépose une goutte de la solution alcoolique de la substance à examiner sur une bande de papier, on pulvérise la solution de p-nitraniline, puis, après séchage, une solution de periodate de sodium, on abandonne à l'air, et une coloration jaune apparaît en cas de réponse positive.

Pour confirmer l'existence de ce groupement 1,2-glycol, nous avons soumis notre tétrol, d'une part à l'action du periodate de sodium en solution éthanolique acidifiée par l'acide sulfurique, et d'autre part à l'action du tétracétate de plomb en solution acétique. Dans aucun cas nous n'avons pu obtenir de substance cristallisée, et la chromatographie sur alumine du produit de la réaction n'a abouti qu'à une substance huileuse. Cette huile, directement traitée par la 2,4-dinitro-phényl-hydrazine, n'a fourni, en plus d'environ 30% du tétrol engagé, que quelques mg de micro-cristaux bruns de point de fusion très élevé, supérieur à 375°. Leur analyse a indiqué un pourcentage d'azote approximativement double de celui de la di-hydrazone attendue.

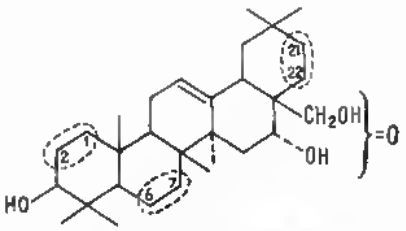
L'analyse élémentaire fournit un pourcentage de carbone très faible, beaucoup plus proche d'une di-hydrazone en C_{15}, ce qui, dans ce cas, tendrait à montrer que l'oxydation aurait provoqué la rupture du système pentacyclique au niveau du noyau C par ouverture de la double liaison 12,13.

Si nous avions pu prouver de façon plus décisive la présence de deux hydroxyles vicinaux dans la génine D hydrogénée, nous aurions pu conclure, en raison de l'obtention du dérivé bromé, qui a mis en évidence la fraction -CO-CH_2-, que le groupement -CO- initial de la génine D ne pouvait être que dans le noyau A en position 2.

Source : MNHN, Paris

Malheureusement, l'imprécision des résultats des oxydations plombique et periodique nous interdit de choisir avec assez de certitude entre les trois groupes de positions 1-2, 6-7 et 21-22, que la bromuration de l'époxyde nous a fait admettre comme les seules possibles pour le -CO-.

Nous nous proposons d'ailleurs, quand nous pourrons disposer d'assez de matériel, de poursuivre l'étude de cette génine afin d'essayer d'en élucider complétement la structure.



Génine D (formule approchée)

Source : MNHN, Paris

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Isolement de la fraction alcaloidique.

2 kg de racines pulvérisées sont extraits par le mélange méthanol-éthanol (1/1) pendant 72 h. L'extrait alcoolique est évaporé jusqu'à consistance pâteuse, incorporé à de la Célite et séché à l'étuve à 40° pendant trois jours. Après pulvérisation, il est extrait par le chloroforme, sur Kumigawa, pendant 8 h.

L'extrait chloroformique, réduit à faible volume, est chromatographié sur 100 g d'alumine.

500 ml de chloroforme élue une fraction positive au réactif de Dragendorff.

500 ml du mélange acétone-éthanol (9/1) élue un autre fraction positive.

Le lavage de la colonne par l'éthanol est négatif.

Les deux éluats positifs sont évaporés à sec, redissous dans le chloroforme et extraits par l'eau légèrement acidifiée par l'acide chlorydrique ; l'extrait aqueux neutralisé par le bicarbonate de soude, est réextrait par le chloroforme. Un dernier extrait, obtenu par l'eau acide, donne après concentration, les réactions suivantes :

— Réactif de Dragendorff : coloration orange intense ;
— Réactif de Meyer précipité abondant ;
— Acide picrique : précipité dense ;
— Acide silicotungstique : précipité très dense.

Une chromatographie sur papier dans le mélange eau-acide acétique (19/1) donne trois taches, révélées par le réactif de Dragendorff :

— La première à Rf 0,10, d'intensité moyenne ;
— La deuxième à Rf 0,40, de faible intensité ;
— La troisième à Rf 0,80, de forte intensité.

L'évaporation à sec de cet extrait laisse un résidu très coloré, pesant environ 20 g.

Aucune cristallisation n'a pu être obtenue, tant de l'extrait que des dérivés.

La méthode de micro-pyrogenation des substances alcaloïdiques de Resplandy [45] permet de déceler la présence d'alcaloïde, directement sur le matériel végétal ; nous l'avons appliquée à *J. armillaris* Jacq. : 1 mg de racine finement pulvérisée est mélangé à 100 mg de chaux vive dans un tube à pyrolyse. Le mélange est chauffé à la flamme, après avoir disposé, entre le tube à pyrolyse et le caoutchouc de la trompe à eau, une petite bande de papier Whatman ; celle-ci absorbe ainsi les bases volatiles éventuellement fournies par la pyrolyse. Le dépôt ainsi obtenu réagit avec intensité avec le réactif de Dragendorff. Ce résultat confirme la présence de

Source : MNHN, Paris

bases volatiles, ou au moins de substances de dégradation ayant gardé la réactivité des alcaloïdes.

Isolement des saponines.

150 g de racines et de tiges pulvérisées sont extraits successivement par 500, 400 et 250 ml d'alcool méthylique.

Le matériel végétal est rebrassé entre chaque opération.

La dilution aqueuse produit un précipité qui est éliminé par filtration.

L'addition d'acétone provoque la précipitation des saponines. Elles sont recueillies sur Buchner, sur lequel elles sont lavées par l'acétone en triturant longuement. On opère sous vide et le séchage est complété par une exposition prolongée à l'air ; le séchage à l'étuve ou dans le dessicateur donnant un produit coloré.

On obtient ainsi 1 g de saponines sous forme d'une poudre blanc crème, fortement sternutatoire.

Rendement = 2,6% du matériel sec.

Essais de déshydratation de la génine C.

a) 100 mg de génine C sont dissous dans 100 ml d'éthanol, on ajoute 6 gouttes d'acide sulfurique concentré et on chauffe 5 mn à l'ébullition. La dilution aqueuse donne un précipité qui, après lavage et séchage, est recristallisé dans l'alcool aqueux à 80%. La substance obtenue est identique à la génine C.

b) 100 mg de génine C sont traités de la même manière, mais en prolongeant l'ébullition à reflux pendant 1 h 1/2, pour aboutir de nouveau à la génine inchangée.

c) L'ébullition à reflux pendant 5 h de 100 mg de génine C, dans 25 ml d'acide formique et 10 gouttes d'acide sulfurique concentré, fournit, après précipitation par l'eau, extraction éthérée et lavage prolongé, une substance amorphe et brune, qui n'a pu être obtenue cristallisée.

Essais de déshydratation des diacétates I et IV.

a) 110 mg de l'acétate I, dissous dans 12,5 ml de pyridine, sont chauffés à reflux pendant 2 h avec 2,5 ml d'oxychlorure de phosphore. La recristallisation dans l'éthanol du précipité obtenu par dilution aqueuse redonne l'acétate de départ inchangé.

b) 100 mg de l'acétate IV sont soumis à un contact de 60 h dans l'acide formique. La recristallisation du précipité dans le methanol redonne l'acétate IV inchangé.

La saponification alcaline redonne la génine C.

Source : MNHN, Paris

Tosylation de l'acétate IV (diacétoxy-3β, 16α).

900 mg de l'acétate, avec 1 g de chlorure de p-toluène sulfonyle, sont dissous dans 20 ml de benzène absolu et 20 ml de pyridine sèche, et laissés une nuit en contact, à la température ordinaire. Le précipité cristallin de chlorure de pyridine est détruit par l'eau, puis on extrait par l'éther. L'extrait éthéré est successivement lavé par l'acide chlorhydrique à 10%, par l'eau, par la soude aqueuse à 5% et par l'eau jusqu'à neutralité. Après avoir séché la solution éthérée sur sulfate de sodium anhydre, on l'évapore à sec.

Le résidu (1,080 g) est redissous dans le mélange éther de pétrole-benzène (3/1) et chromatographié sur 30 g d'alumine.

Le mélange éther de pétrole-benzène (3/1) élue des traces d'huile.

Le mélange éther de pétrole-benzène (1/1) élue 300 mg d'une substance semi-cristalline, F 100-130°.

Le mélange benzène-éther (1/1) élue 500 mg de l'acétate inchangé.

La même réaction, refaite en chauffant le mélange réactionnel à reflux pendant 4 h à 150°, donne, à partir de 600 mg du diacétate IV, 300 mg du dérivé tosylé et 200 mg de l'acétate inchangé.

Trois recristallisations, dans le mélange éther de pétrole-éther, fournissent 200 mg de cristaux en aiguilles, F 193-195°.

Trouvé		C	70,81	H	8,72
Calculé	%		70,65		8,68
$C_{41}H_{60}O_7S$					

Dérivé iodé a partir du tosylate.

100 mg de tosylate sont dissous dans 20 ml d'acétone absolue et chauffés une nuit en tube scellé à 200° avec 100 mg d'iodure de sodium. L'acétone est évaporée à faible volume et la solution restante est versée dans l'eau. Le gel blanc, qui en résulte, est extrait par l'éther. L'extrait éthéré est lavé avec une solution de thiosulfate de sodium, puis avec l'eau, et séché sur sulfate de sodium anhydre. L'évaporation de l'éther donne un résidu sec blanc crème qui est recristallisé trois fois dans un mélange de chloroforme et d'éthanol absolu. On obtient 210 mg d'aiguilles incolores, F 234-236°.

Trouvé		C	62,51	H	8,34
Calculé	%		62,56		8,19
$C_{34}H_{50}O_4I$					

Réduction de l'iodure.

a) 200 mg de l'iodure, dissous dans 5 ml de dioxane, sont agités 2 h sous hydrogène, en présence d'un peu de nickel Raney et de 18 mg de potasse. Seuls, 135 mg de l'iodure inchangé sont récupérés.

b) 135 mg de l'iodure sont dissous dans un mélange de dioxane et d'éthanol absolu (1/1) avec 12 mg de potasse et en présence d'un large

Source : MNHN, Paris

excès de nickel RANEY. La solution jaunit immédiatement et se redécolore par la suite.

Après 2 h d'agitation, il n'y a plus d'absorption observable d'hydrogène.

Consommation théorique = 5 cm³

» observée = 1,9 cm³.

Après élimination du nickel par filtration, le solvant est évaporé et le résidu résultant (124 mg) est redissous dans un mélange de chloroforme et de méthanol.

La cristallisation n'ayant pu être obtenue, le résidu est chromatographié sur alumine dans le mélange éther de pétrole-benzène (3/1). L'élution fournit 80 mg d'une substance semi-cristalline, F ~ 220°.

Cette substance est saponifiée par ébullition à reflux pendant 1 h dans 10 ml de potasse méthanolique N. On dilue par l'eau et extrait par l'éther. L'évaporation de l'éther laisse, après lavage et séchage, un résidu sec (50 mg) qui est redissous dans le mélange éther de pétrole-acétone. Il se forme une substance semi-cristalline, F 180-190°.

OXYDATION CHROMIQUE DU DIACÉTATE IV.

A 500 mg de l'acétate, dissous dans 50 ml d'acide acétique glacial, on ajoute goutte à goutte, en agitant, la solution de 113 mg d'anhydre chromique dans 5 ml d'acide acétique glacial additionné de quelques gouttes d'eau. Pendant ce temps, on maintient la température du mélange à 50°, puis on chauffe sur bain-marie bouillant pendant 30 min. On évapore sous vide jusqu'à un volume de 15 ml environ, avant de diluer par l'eau. L'acide acétique est neutralisé jusqu'à pH 6 par une solution aqueuse de carbonate de soude à 5%, en évitant d'alcaliniser franchement pour ne pas provoquer une saponification partielle de l'acétate engagé.

On extrait par l'éther, et l'extrait éthéré est successivement lavé par l'eau, l'acide sulfurique à 10%, et finalement par l'eau.

Après séchage et évaporation de l'éther, le résidu blanc crème (517 mg) est dissous dans le benzène et chromatographié sur 25 g d'alumine.

Le benzène élue 231 mg de semi-cristaux, F 150-155°.

Le mélange benzène-éther (1/1) élue 20 mg de semi-cristaux, F 225-230°.

Le mélange benzène-éther-méthanol (10/9/1) élue 15 mg d'huile.

Le mélange méthanol-acide acétique (9/1) élue 211 mg de substance amorphe.

Trois recristallisations dans le méthanol du produit du premier éluat remonte le point de fusion à 178° (banc KOFLER) et 179-180° (bloc MAQUENNE).

Trouvé		C	75,54	75,69	H	9,41	9,63
Calculé	%		75,56			9,63	
$C_{34}H_{52}O_5$							

Ce corps donne une réponse positive au réactif de LIEBERMANN, au tétranitrométhane et à la 2,4-dinitrophényl-hydrazine.

Les 211 mg de substance amorphe, donnés par le dernier éluat, sont redissous dans l'éther. La solution éthérée est extraite par la soude aqueuse

Source : MNHN, Paris

à 5%. L'extrait alcalin est réacidifié par l'acide chlorhydrique et réextrait par l'éther et le chloroforme. L'évaporation des solvants laisse un résidu coloré (50 mg) qui n'a pu être cristallisé.

Oxydation chromique du triacétate II.

1 g du triacétate est dissous dans 50 ml d'acide acétique glacial. On ajoute goutte à goutte, à chaud, une solution de 286 mg d'anhydride chromique dans 10 ml d'acide acétique additionné de quelques gouttes d'eau. L'ébullition à reflux est continuée pendant 15 min. Le mélange réactionnel est versé dans l'eau ; le précipité résultant est essoré, longuement lavé par l'eau et séché (1 g).

Deux recristallisations dans le méthanol fournissent 850 mg d'une substance cristalline, F 130° ; resolidification, F 212-123°.

ETOH

Spectre U.V. = max. 248 mμ

Ne réagit ni avec le tétranitrométhane, ni avec le réactif de Liebermann.

Trouvé		C	70,45	70,39	H	8,50	8,77
Calculé	%		70,35			8,79	
$C_{30}H_{44}O_6$							

dinitro-2,4-phénylhydrazone de la génine D.

100 mg de génine et 75 mg de 2,4-dinitrophénylhydrazine sont chauffés jusqu'à ébullition dans 5 ml d'éthanol. Deux gouttes d'acide chlorhydrique sont alors ajoutées et le reflux est poursuivi pendant 5 mn. Après 4 h de repos, 105 mg de cristaux jaune-orangé sont recueillis, F 247-252°, remonté à 255-256° après deux recristallisations dans l'éthanol.

Trouvé		C	65,86	H	8,30	N	8,63
Calculé	%		66,03		8,31		8,56
$C_{36}H_{44}O_7N_4$							

Epoxyde de la génine D.

400 mg de l'acétate de la génine D sont dissous dans 20 ml d'acide acétique glacial, puis, après addition de 1 ml d'eau oxygénée (30 volumes), chauffés à reflux sur bain-marie pendant 2 h. On dilue par l'eau. Le précipité formé est essoré, séché et redissous dans l'éthanol. On obtient, après recristallisation, 280 mg de cristaux, F 238-244°, dont la solution dans le chloroforme reste incolore en présence de tétranitrométhane.

Trouvé		C	70,64		H	8,97	
Calculé	%		70,32			8,85	
$C_{30}H_{44}O_6$							

L'époxyde de l'acétate est saponifié par ébullition à reflux pendant 2 h dans 15 ml de potasse méthanolique à 5%. On dilue par l'eau et extrait

Source : MNHN, Paris

par l'éther. L'extrait éthéré est lavé par l'eau, séché sur sulfate de sodium anhydre et évaporé à sec.

Le résidu (150 mg) est redissous dans l'éthanol dans lequel il forme des cristaux, F 262-263°. Il reste incolore avec le tétranitrométhane.

Trouvé		C	73,68	H	9,64
Calculé	%		73,72		9,90
$C_{30}H_{48}O_5$					

Réduction Wolff-Kishner (modifiée par Huang-Minlon)

500 mg de génine D (1,06 mole), 200 mg de potasse (3,6 mole) et 0,5 ml d'hydrazine à 85% sont chauffés à reflux pendant 90 mn dans 5 ml de diéthylène glycol ; puis on vide le réfrigérant pour laisser monter la température à 195°, on la maintient à ce niveau pendant 4 h. Après refroidissement, on dilue avec 5 ml d'eau et on ajoute 3 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Le gel grisâtre formé est essoré sur verre fritté et lavé longuement par l'eau pour éliminer le glycol et l'hydrazine en excès.

Le précipité séché (600 mg) n'est que partiellement dissous par l'éthanol. Une deuxième filtration sur verre fritté retient une substance minérale pulvérulente.

La recristallisation n'ayant pu être obtenue, le résidu résultant de l'évaporation de l'alcool est redissous dans le benzène et chromatographié sur 20 g d'alumine.

Le benzène n'élue rien.

Le mélange benzène-éther (9/1) n'élue que des traces de matière.

Le mélange benzène-éther (1/1) élue 160 mg d'une substance répondant positivement au réactif de Nolleau.

Cette dernière substance fournit, après deux recristallisations, dans l'éthanol aqueux à 80%, 60 mg de fines aiguilles, F 245° (microscope), 249° (banc), $[\alpha]_D^{21°} + 47°$ (0,995), n'abaissant pas le point de fusion de la génine C.

Trouvé		C	78,53	H	11,03
Calculé	%		78,55		10,99
$C_{30}H_{50}O_3$					

50 mg du produit de la réduction donnent, par acétylation pyridinée (12 h à la température ordinaire), et après deux cristallisations dans le méthanol, 15 mg de cristaux en aiguilles, F 208-210°, n'abaissant pas le point de fusion du diacétate I de la génine C.

Trouvé		C	75,25	75,36	H	9,45	9,75
Calculé	%		75,23			10,03	
$C_{34}H_{54}O_5$							

Source : MNHN, Paris

Hydrogénation de la génine D par Li Al H_4.

200 mg de génine D et 300 mg d'hydrure double de lithium et d'aluminium sont agités pendant 3 h à la température ordinaire dans 50 ml de tétrahydrofurane.

Le mélange réactionnel est alors versé dans une solution d'acide chlorhydrique à 10% maintenue à 0°.

Lorsque l'effervescence est terminée, on vérifie la fin de la réaction en ajoutant un peu d'acide chlorhydrique concentré.

On extrait par l'éther, et on lave l'extrait éthéré par le bicarbonate de sodium, puis par l'eau jusqu'à neutralité.

Après évaporation de l'éther, le résidu est redissous dans l'éthanol et, après deux recristallisations dans ce solvant, on obtient 90 mg d'aiguilles courtes, F 285-290°, abaissant à 270-271° le point de fusion de la génine D.

L'acétylation pyridinée de 10 mg du produit d'hydrogénation fournit, après 20 h de contact à la température ordinaire, 22 mg de plaquettes, F 230-237°, abaissant à 185-190° le point de fusion de l'acétate de la génine D.

Oxydation chromique de la génine D.

500 mg de génine D, dissous dans 8 ml de pyridine, sont traités, à 0°, par 1,8 g d'anhydride chromique dissous dans 18 ml de pyridine ; on laisse en contact une nuit à la température ordinaire.

Après dilution par l'eau, on extrait par l'éther. L'extrait éthéré est lavé par l'eau, puis par la soude aqueuse à 5% et par l'eau ; on sèche sur sulfate de sodium anhydre et, enfin, on évapore à sec.

Le résidu, dissous dans le benzène est chromatographié sur 20 g d'alumine.

Le benzène n'élue rien.

Le mélange benzène-éther (3/1) élue une substance fortement colorée.

La décoloration partielle obtenue par le charbon, la filtration sur célite et deux cristallisations dans l'éthanol, donnent 8 mg de cristaux en plaquettes épaisses, F 245-250°.

Trouvé		C	76,89	H	9,35
Calculé	%		76,88		9,45

$C_{30}H_{44}O_4$

Spectre U.V. $= \frac{\text{ETOH}}{\text{max.}}$ 212 mμ et 275 mμ

La réacidification par l'acide chlorhydrique des lavages alcalins ne fournit aucune substance acide.

Oxydation chromique de l'acétate de la génine D.

1 g de génine D est acétylé de la manière habituelle. Le précipité obtenu par dilution aqueuse (1,270 g) est directement soumis à l'oxydation. Il est dissous à chaud dans 50 ml d'acide acétique glacial. On ajoute goutte à goutte la solution de 250 mg d'anhydride chromique dans 10 ml d'acide acétique et quelques gouttes d'eau. On chauffe à reflux, vers 160°, pendant

Source : MNHN, Paris

90 mn. On chasse sous vide la plus grande partie de l'acide acétique, et, après avoir ajouté un peu d'alcool, on dilue par l'eau. Le précipité obtenu est lavé par l'eau, séché, puis redissous dans l'éther. La solution éthérée est lavée par l'eau, la soude aqueuse à 10% et par l'eau jusqu'à neutralité. On sèche sur sulfate de sodium anhydre, puis on évapore à sec.

Le résidu (1,120 g) est dissous dans le benzène et chromatographié sur 30 g d'alumine.

Le benzène n'élue rien.

Les mélanges benzène-éther (19/1) et (1/1), éther-méthanol (19/1) et (1/1) éluent 800 g d'une substance semi-cristalline, qui est recristallisée deux fois dans le méthanol, F 145°, resolidification, F 214-216°.

Spectre U.V. – $\overset{\text{ETOH}}{\text{max.}}$ 215 mμ.

Ce corps ne réagit plus, ni avec le tétranitrométhane, ni avec le réactif de Liebermann.

Trouvé		C	70,63	H	8,71
Calculé	%		70,55		8,55

$C_{36}H_{52}O_8$

Les lavages alcalins, réacidifiés par l'acide chlorhydrique, forment un léger louche. Leur extrait éthéré ne laisse, après évaporation sous vide, que des traces d'une substance jaune amorphe.

Hydrogénation de la génine D par le borohydrure de potassium et le chlorure de lithium.

1 g de génine D et 0,1 g de borohydrure de potassium sont mis en suspension dans 20 ml de tétrahydrofuranne sec. On ajoute, en agitant, 0,335 g de chlorure de lithium préalablement séché à l'étuve et pulvérisé. On agite 15 mn à la température ordinaire, puis 1 h 30 en chauffant à l'ébullition à reflux. Après refroidissement, on dilue par l'eau et extrait par l'éther. Le précipité formé par la dilution aqueuse est très peu soluble dans l'éther ; on continue l'extraction avec le butanol.

Les solutions extractives, après lavages successifs par l'eau, l'acide chlorhydrique aqueux à 10%, l'eau, la soude aqueuse à 10% et l'eau, sont séchées sur sulfate de soude anhydre, et évaporées à sec.

Le résidu (810 mg) est dissous dans le benzène et chromatographié sur 25 g d'alumine.

Le benzène élue 25 mg d'huile.

Le mélange benzène-acétone (1/1) élue 775 mg d'une substance cristalline F ~ 290°.

200 mg de cette substance sont acétylés par ébullition à reflux pendant 90 mn dans 4 ml de pyridine et 2 ml d'anhydride acétique. Le précipité, obtenu par dilution aqueuse, est recristallisé deux fois dans l'éthanol, donnant 200 mg de grandes aiguilles, F 238-239°, abaissant à 125-180° le point de fusion de l'acétate de la génine D.

Trouvé		C	70,64	H	9,14
Calculé	%		70,99		9,09

$C_{38}H_{58}O_8$

Source : MNHN, Paris

100 mg du tétracétate sont chauffés à reflux pendant 1 h dans 10 ml de potasse méthanolique à 5%. Les micro-cristaux, formés au cours de la saponification, sont essorés et lavés longuement par l'eau, puis par l'acétone, F 300-302°, abaissant à 290-292° le point de fusion de la génine D.

Trouvé		C	75,74		H	10,78
Calculé	%		75,90			10,62
$C_{30}H_{50}O_4$						

Bromuration de l'époxyde de la génine D.

a) Acétylation pyridinée, selon la technique habituelle, de 500 mg de génine D.

b) 500 mg de l'acétate obtenu et 1,5 ml de H_2O_2 dans 25 ml d'acide acétique sont soumis à l'ébullition à reflux pendant 1 h 1/2, donnant 400 mg de l'époxyde de l'acétate.

c) L'époxyde de l'acétate est soumis à l'ébullition à reflux pendant 2 h dans 15 ml de potasse méthanolique N, libérant 300 mg de l'époxyde de la génine D. F (après recristallisation dans l'éthanol) 269-270°.

d) 200 mg de l'époxyde de la génine D sont laissés 36 h en contact avec 275 mg de perbromure de triméthylphényl ammonium. Les cristaux incolores se déposent rapidement. Après chromatographie sur alumine et recristallisation dans l'éthanol le point de F = 253-254°.

L'analyse correspond à la formule brute $C_{30}H_{47}O_5Br$.

Trouvé		C	63,40	H	8,49	Br	14,71	14,62
Calculé	%		63,47		8,35		14,07	—

Oxydation périodique du tétrol.

50 mg du tétrol sont dissous dans 20 ml d'éthanol. On ajoute 75 mg de periodate de sodium dissous dans 3 ml de H_2SO_4N. On laisse 24 h au repos à la température ordinaire. Le mélange est versé dans l'eau, puis extrait par l'éther. L'évaporation de l'éther laisse un résidu qui, n'ayant pu être cristallisé, a été chromatographié sur 10 g d'alumine. L'élution fournit 30 mg du tétrol n'ayant pas réagi et quelques mg d'une huile.

La même opération répétée sur 100 mg de tétrol en prolongeant le temps de contact à 4 jours aboutit, après chromatographie sur alumine, à la récupération de 25 mg du tetrol inchangé et d'environ 40 mg d'une huile qui n'a pu être cristallisée.

Oxydation plombique du tétrol.

a) *Avec le tétracétate de plomb du commerce.*

100 mg de tétrol en suspension dans 3 ml d'acide acétique et 110 mg de tétracétate de plomb commercial, recristallisé dans l'acide acétique, sont mélangés à 34° et laissés en contact 48 h à la température ordinaire en agitant de temps à autre.

Source : MNHN, Paris

Après destruction du $Pb(OAc)_4$ en excès par quelques gouttes d'éthylène glycol, le mélange est versé dans l'eau, et extrait par l'éther. L'extrait est lavé par la soude à 5% et par l'eau.

L'évaporation de l'éther laisse un résidu de 80 mg qui est chromatographié sur 15 g d'alumine. Successivement, 60 g du tétrol inchangé et 10 mg d'huile sont récupérés.

b) *Avec le tétracétate de plomb préparé extemporanément.*

Dans 150 ml d'acide acétique, maintenu à 55-65°, on introduit 60 g de minium par petites fractions, attendant la décoloration de la solution entre chaque fraction. Après refroidissement, le solide formé est essoré et lavé avec l'acide acétique. Le gâteau, pressé, est redissous dans 20 ml d'acide acétique en maintenant la température à 50°. Au refroidissement on recueille environ 30 g de longues aiguilles incolores de $Pb(OAc)_4$.

150 mg de tétrol et 175 mg de tétracétate de plomb traités comme ci-dessus donnant 10 mg de tétrol inchangé et environ 80 mg d'huile incristallisable.

DINITRO-2,4-PHÉNYLHYDRAZONE DU TÉTROL OXYDÉ.

80 mg de l'huile obtenue précédemment et 60 mg de dinitro-2,4-phénylhydrazine sont dissous dans 10 ml d'éthanol. Quand le mélange arrive à ébullition, 2 gouttes d'acide chlorhydrique concentré sont ajoutées et le chauffage à reflux est continué pendant 5 minutes.

Au refroidissement, on obtient successivement 10 mg de cristaux de 2,4-dinitrophénylhydrazine n'ayant pas réagi, 10 mg du tétrol de départ, inchangé et environ 10 mg de cristaux brun sombre, F > 375°.

Trouvé	C 49,03	48,70	H 4,69	4,49	N 23,28	23,98
Calculé %						
$C_{42}H_{54}O_{10}N_8$	60,72		6,50		13,49	
$C_{24}H_{32}O_{12}N_{12}$	48,69		4,18		22,0	

Source : MNHN, Paris

CONCLUSION

Jacquinia armillaris Jacq. qui, à notre connaissance, n'a été l'objet d'aucune étude chimique jusqu'à ce jour, recèle une fraction triterpénique d'une teneur de l'ordre de 2%.

Cette fraction s'est révélée très complexe. Nous en avons isolé quatre alcools, que nous avons dénommés armillarigénines.

Leurs teneurs respectives sont très différentes. C'est à l'étude des deux plus abondantes qu'a été consacré ce travail.

Leur séparation et leur purification, tant par chromatographie que par obtention de divers dérivés, se sont révélées très laborieuses.

La première, la genine C, a été, après un long travail, identifiée à la primulagénine A.

La deuxième, la génine D, a été apparentée à la génine C, à un groupement cétonique près. L'emplacement de celui-ci n'a pu être fixé avec certitude car le choix entre les trois positions restant seules possibles, compte tenu des résultats expérimentaux, se révélait trop incertain du fait de l'imprécision des dernières expériences. Toutefois, la position 2 nous paraît la plus probable.

Nous nous proposons, dès que les circonstances et la disponibilité d'un matériel végétal suffisant nous le permettront, d'en poursuivre l'étude pour essayer d'entièrement élucider cette structure.

Source : MNHN, Paris

BIBLIOGRAPHIE

[1] C. Sannié, S. Heitz (Mme) et H. Lapin. — *C.R.Ac. Sci.*, *233*, 1951, p. 1670-1672.
[2] R. Munier et M. Macheboeuf. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *32*, 1951, p. 349.
[3] J. J. Scheidegger et E. Cherbulier. — *Helv.*, *38*, 1955, p. 547.
[4] C. Djerassi et Coll. — *J. amer. Chem. Soc.*, *79*, 1957, p. 3525.
[5] C. H. Brinskorn et G. H. Mahran. — *Naturwiss.*, *47*, 1959, p. 107-108.
[6] R. Girard. — *Ann. Chim. Anal.*, *32*, 1950, p. 55.
[7] M.-R. de Maheas. — *C.R.Ac. Sci.*, *249*, 1959, p. 1799.
[8] L. Ruzicka et S. L. Chien. — *Helv.*, *20*, 1937, p. 804.
[9] A. Meyer, O. Jeger et L. Ruzicka. — *Helv.*, *33*, 1950.
[10] C. Djerassi, L. E. Geller et A. J. Lemin. — *J. Amer. Chem. Soc.*, *76*, 1954, p. 4089.
[11] A. Margot et T. Reichstein. — *Pharm. acta Helv.*, *17*, 1942, p. 113-140.
[12] O. Jeger, Cl. Nisoli et L. Ruzicka. — *Helv.*, *29*, 1946, p. 1183.
[13] B. Bischof et O. Jeger. — *Helv.*, *31*, 1948, p. 1760.
[14] W. R. White et C. R. Noller. — *J. Amer. Chem. Soc.*, *61*, 1939, p. 983.
[15] R. N. Jones, D. Todd et C. R. Noller. — *Id.*, *61*, 1939, p. 2421.
[16] D. Todd, G. H. Harris et C. R. Noller. — *Id.*, *62*, 14, 1940, p. 1624.
[17] J. F. Carson et C. R. Noller. — *Id.*, *63*, 1941, p. 621, 2238.
[18] G. H. Harris et C. R. Noller. — *Id.*, *66*, 1944, p. 1005.
[19] J. F. Carson, D. B. Cosulich et C. R. Noller. — *Id.*, *66*, 1944, p. 1265.
[20] D. Frazier et C. R. Noller. — *Id.*, *66*, 1944, p. 1267.
[21] F. A. Alves et C. R. Noller. — *Id.*, *74*, 1952, p. 4043.
[22] A. Winterstein et G. Stein. — *Annalen*, *502*, 1933, p. 223.
[23] D. F. Elliot et G. A. R. Kon. — *J. Chem. Soc.*, 1939, p. 1130.
[24] D. F. Elliot, G. A. R. Kon et H. R. Soper. — *Id.*, 1940, p. 612.
[25] G. A. R. Kon et H. R. Super. — *Id.*, 1940, p. 1335.
[26] P. Bilham et G. A. R. Kon. — *Id.*, 1940, p. 1469.
[27] P. Bilham et G. A. R. Kon. — *Id.*, 1941, p. 552.
[28] P. Bilham, G. A. R. Kon et G. J. Ross. — *Id.*, 1942, p. 532.
[29] L. Ruzicka, Cl. Nisoli et O. Jeger. — *Helv.*, *29*, 1946, p. 2017.
[30] O. Jeger, B. Bischof et L. Ruzicka. — *Helv.*, *31*, 1948, p. 1319.
[31] B. Bischof, O. Jeger et L. Ruzicka. — *Id.*, *32*, 1949, p. 1211.
[32] F. S. Spring et T. Vickerstaff. — *J. Chem. Soc.*, 1954, p. 1859.
[33] M. Ferrejacque. — *Bull.*, 5e série, *6*, 1939, p. 1008.
[34] R. Tschesche et A. Heesch. — *Ber. dtsch. Ch. Gesell.*, *85*, 1952, p. 1067.
[35] F. S. Spring et T. Vickerstaff. — *J. Chem. Soc.*, 1937, p. 219.
[36] Huang-minlon. — *J. Amer. Chem. Soc.*, *68*, 1946, p. 2487.
[37] R. Paul et N. Joseph. — *Bull.*, 1952, p. 550.
[38] von F. G. Fischer et N. Seiler. — *Annalen*, *626*, 1959, p. 185.
[39] L. Ruzicka et Coll. — *Helv.*, *33*, 1950, p. 672.
[40] R. Anantaraman et K. S. Pilai. — *J. Chem. Soc.*, 1956, p. 4369.
[41] C. Djerassi et Coll. — *J. Amer. Chem. Soc.*, *79*, 1957, p. 4468.
[42] M. Ferrejacque et M. Durgeat (Mme). — *C.R.Ac. Sci.*, *236*, 1953, p. 110-112.
[43] Jacques et Marquet (Mlle). — *Tétrahédron*, 1959, p. 24.
[44] D. Brule et C. Mentzer. — *C.R.Ac. Sci.*, *250*, 1960, p. 365.
[45] A. Rosplandy. — *C.R.Ac. Sci.*, *246*, 1958, p. 461-464.

Achevé d'imprimer le 30 novembre 1962.

Printed in France. *Le Directeur :* Prof. E. Séguy.

Pobjoy Angoué, imp., 244 boulevard Raspail, Paris 14.
Dépôt légal : 1er trimestre 1961.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris